



# THU NHẬN VÀ KHẢO SÁT MỘT SỐ TÍNH CHẤT CỦA CHẾ PHẨM FICIN TỪ NHỰA QUẢ VÀ (*Ficus auriculata* L.)

Võ Văn Quốc Bảo\*, Nguyễn Thành Trung

Trường Đại học Nông Lâm, Đại học Huế, 102 Phùng Hưng, Huế, Việt Nam

**Tóm tắt:** Trong công trình này, chúng tôi đã nghiên cứu các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình thu nhận chế phẩm ficin từ dịch nhựa quả và cũng như khảo sát một số tính chất đặc trưng của chế phẩm enzyme nhằm nâng cao giá trị sử dụng của quả và tại Thừa Thiên Huế. Quả và đạt độ chín thu hoạch cho hàm lượng protein và hoạt độ protease cao nhất, tương ứng là 2,212 mg/ml và 1,077 Hp/ml khi tỷ lệ giữa dịch nhựa quả và ethanol 96 % là 1/4 và nhiệt độ chiết là 3 °C. Thời gian thu nhận enzyme này thích hợp nhất là 60 phút. Chế phẩm protease hoạt động thích hợp ở 45 °C, pH = 6, bền nhiệt từ 35 °C đến 50 °C trong 1 giờ.

**Từ khóa:** quả vả, dịch nhựa, ficin, hoạt độ protease, ethanol

## 1 Đặt vấn đề

Enzyme ficin hay còn gọi là ficain, một thiol-protease có nhiều trong dịch nhựa của các loài cây vả, sung thuộc giống *Ficus*, họ *Moraceae*. Tương tự các protease thực vật khác (papain, bromelain), ficin cũng chứa nhóm sulfhydryl (-SH) ở trung tâm hoạt động, quyết định hoạt tính xúc tác của enzyme [1]. Enzyme ficin được sử dụng nhiều nhất trong một số ngành sản xuất như chế biến thực phẩm (làm formage, làm mềm thịt, bổ sung để chống lại hiện tượng tủa protein trong quá trình làm trong bia, ngăn cản sự hóa nâu trong rau củ, xử lý phế phụ phẩm trong chế biến phế thực phẩm...), trong y học như làm thuốc hỗ trợ tiêu hóa, tẩy giun. Ngoài ra, ficin có nhiều ứng dụng đang được nghiên cứu như sản xuất thuốc làm tan máu bầm, trị bệnh ngoài da, mụn nhọt [4, 12, 15, 17].

Việt Nam nằm trong vùng khí hậu nhiệt đới nên các loại cây họ sung nói chung và loại cây vả nói riêng phát triển rất thích hợp. Tuy nhiên, sản phẩm từ cây vả chỉ được biết đến qua các món thực phẩm được dùng hằng ngày như vả trộn, vả kho thịt, hay dùng làm rau... mà chưa có nhiều nghiên cứu về enzyme protease trên loại cây này. Lá và quả vả là nguồn nguyên liệu để sản xuất enzyme do chứa một lượng lớn protease gọi là ficin. Bên cạnh hai loại enzyme từ thực vật đã được nghiên cứu tương đối rõ ràng và có nhiều ứng dụng cụ thể là bromelain và papain, việc nghiên cứu khảo sát các điều kiện tách chiết protease từ quả vả sẽ có ý nghĩa khoa học và thực tiễn.

\* Liên hệ: vovanquocbao@huaf.edu.vn

## 2 Đối tượng và phương pháp

### 2.1 Đối tượng

Dịch nhựa quả vả (*ficus auriculata* Lour) được thu nhận tại các nhà vườn trên địa bàn tỉnh Thừa Thiên Huế.

### 2.2 Phương pháp

#### Bố trí thí nghiệm

Để thu nhận chế phẩm ficin đạt chất lượng cao, quá trình thí nghiệm luôn được tiến hành trong điều kiện lạnh. Hòa tan 5g dịch nhựa quả vả với nước cất theo tỉ lệ 1/2. Sử dụng máy khuấy từ (100 vòng/phút), trong thời gian 2–3 phút để tạo điều kiện cho quá trình hòa tan được triệt để. Tiếp theo, dung dịch được tách tạp chất và các phần không tan bằng máy ly tâm lạnh (4000 vòng/phút, trong 10 phút). Sau khi ly tâm, lớp cặn dưới đáy và phần dịch trắng đục nổi lên trên bề mặt được loại bỏ. Phần dịch ở giữa, gọi là dịch chứa enzyme, được thu nhận để tiến hành kết tủa protein bằng dung môi hữu cơ (ethanol 96 % và aceton) [11, 12, 13]. Tỷ lệ giữa dịch chứa enzyme và dung môi là 1/1, 1/2, 1/3, 1/4 và 1/5; thời gian kết tủa là 30, 60 và 90 phút; nhiệt độ kết tủa 1, 3 và 5°C. Dựa vào phương pháp loại suy để chọn các thông số thích hợp cho quá trình kết tủa protein có trong dịch mủ. Để thu nhận tủa protein chúng tôi tiến hành ly tâm lạnh (10000 vòng/phút, 10 phút). Lượng tủa lắng xuống dưới sẽ được sấy khô trong vòng 2–3 giờ; sau đó hòa trong dung dịch đệm phosphat để tiến hành đo hàm lượng protein bằng phương pháp Bradford và hoạt độ protease bằng phương pháp Amano. Ảnh hưởng của pH và nhiệt độ lên enzym cũng được khảo sát.

#### Các phương pháp phân tích

##### Xác định hàm lượng protein

Hàm lượng protein được xác định theo phương pháp của Bradford [10]. Phương pháp này dựa trên sự thay đổi bước sóng hấp thụ cực đại và sự thay đổi màu xảy ra khi Coomassie Brilliant Blue liên kết với protein trong dung dịch acid. Trong dung dịch với pH thấp, khi không liên kết với protein thì thuốc nhuộm có bước sóng hấp thụ cực đại ở 465 nm. Khi kết hợp với protein thì thuốc nhuộm hấp thụ bước sóng cực đại ở 595 nm. Độ hấp thụ ở bước sóng 596 nm có liên hệ một cách trực tiếp với nồng độ protein.

Để xác định protein trong mẫu, đầu tiên ta xây dựng một đường chuẩn Albumine với dung dịch protein chuẩn đã biết trước nồng độ. Sau khi cho dung dịch protein vào thuốc nhuộm màu, màu sẽ xuất hiện sau 2 phút và bền tới 1 giờ. Tiến hành đo dung dịch bằng quang phổ kế ta được  $OD_x$ , độ hấp thụ sẽ tỷ lệ với lượng protein trong mẫu. Thực hiện một đối chứng với HCl ( $OD_0$ ). Lấy giá trị  $\Delta OD = OD_x - OD_0$ . Lượng protein trong mẫu dung dịch đo được xác

định bằng cách dựa vào đường chuẩn từ giá trị  $\Delta OD$  ở trục tung, từ đó suy ra giá trị nồng độ protein tương ứng trên trục hoành [6].

Tổng hàm lượng protein trong  $V$  (ml) chế phẩm thô được tính theo công thức

$$\text{mg}_{\text{protein}} = b \times 10^{-3} \times m \times V$$

trong đó  $b$  là nồng độ protein trong mẫu suy ra từ đường chuẩn (mg/ml);  $m$  là hệ số pha loãng,  $V$  là thể tích dung dịch chế phẩm enzyme thô (ml).

### Xác định hoạt độ protease

Hoạt độ protease được xác định theo phương pháp Amano. Xác định độ hoạt động phân giải protein của enzyme trên cơ sở xác định lượng sản phẩm được tạo thành trong phản ứng, bằng phản ứng màu với thuốc thử folin – localteau. Dựa vào đồ thị đường chuẩn, định lượng tyrosin tương ứng với lượng sản phẩm thủy phân dưới tác dụng của enzyme [4]. Đơn vị hoạt độ của proteolytic (casein) là lượng enzyme mà trong 1 giờ ở 30 °C có khả năng phân giải protein tạo các sản phẩm hòa tan trong acid trichloroacetic, cho phản ứng màu với thuốc thử folin – localteau. Tương tự xác định hàm lượng protein, tiến hành đo dung dịch bằng quang phổ kế ta được  $OD_x$ . Dựa vào đồ thị đường chuẩn, định lượng tyrosin tương ứng với  $1\mu\text{g}$  tyrosin. Hoạt động riêng của các chế phẩm được biểu diễn bằng số đơn vị hoạt độ proteolytic trên 1 ml protein chế phẩm. Tính số đơn vị hoạt độ proteolytic của 0,2 ml dung dịch enzyme đã lấy, xác định hoạt độ theo công thức

$$Hp/\text{ml} = \frac{\mu\text{g tyrosin} \times 0,8}{t} (\text{đơn vị})$$

trong đó 0,8 là thể tích toàn bộ hỗn hợp phản ứng (0,2 ml cơ chất; 0,2 ml dung dịch enzyme; 0,4 ml dung dịch TCA (acid trichloroacetic));  $t$  là thời gian để enzyme tác dụng với cơ chất (30 phút).

### Xử lý số liệu

Mỗi thí nghiệm được tiến hành lặp lại 3 lần. So sánh sự khác biệt về giá trị trung bình bằng phân tích phương sai (ANOVA) theo mô hình một yếu tố và kiểm định LSD. Số liệu được xử lý bằng phần mềm tiêu chuẩn Minitab 16.2.3.0.

## 3 Kết quả và thảo luận

### 3.1 Khảo sát dung môi kết tủa

Có rất nhiều dung môi hữu cơ để tách chiết protease có nguồn gốc từ thực vật, nhưng trong nghiên cứu này và dựa trên một số thí nghiệm khảo sát sơ bộ, chúng tôi sử dụng hai dung môi hữu cơ: ethanol 96 % và acetone với mục đích để so sánh hiệu suất thu hồi

protease và lựa chọn dung môi thích hợp. Quá trình tiến hành thí nghiệm như được mô tả ở phần bố trí thí nghiệm và chọn thời gian kết tủa 60 phút, trong điều kiện lạnh 5 °C và tỷ lệ dịch chứa enzyme/dung môi là 1/4. Hàm lượng protein và hoạt độ protease được trình bày ở Bảng 1.

**Bảng 1.** Hàm lượng protein và hoạt độ protease theo từng loại dung môi

Dung môi	Hàm lượng protein (mg/ml)	Hoạt độ protease (Hp/ml)
Ethanol 96 %	1,984 <sup>a</sup>	1,013 <sup>a</sup>
Aceton	1,729 <sup>b</sup>	0,724 <sup>b</sup>

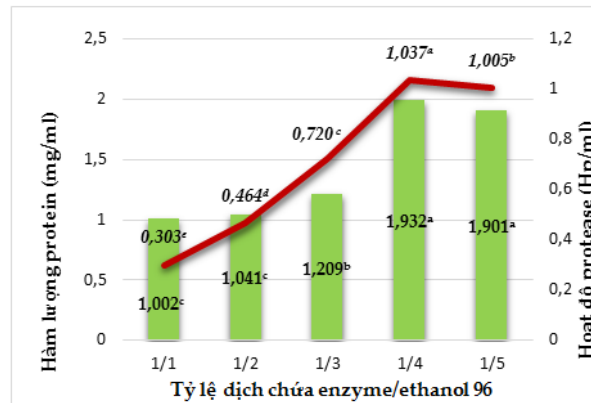
*Chú thích:* Các chữ cái a, b, c thể hiện sự khác nhau có ý nghĩa thống kê ở độ tin cậy 95 % thể hiện theo từng cột trong bảng.

Số liệu cho thấy ethanol 96 % cho giá trị hàm lượng protein và hoạt độ protease cao hơn, tương ứng 1,984 mg/ml và 1,013 Hp/ml. Kết quả này cũng cho thấy khả năng thu nhận protease phụ thuộc vào loại dung môi sử dụng để kết tủa; tùy thuộc vào tính chất và đặc điểm về cấu trúc của mỗi loại thực vật mà loại dung môi sử dụng để kết tủa khác nhau. Kết quả này phù hợp với công bố của nhóm tác giả Nguyễn Thị Thụy Vy và Nguyễn Văn Mười (2016) [8], khi so sánh hiệu quả thu nhận protease từ đầu tôm bằng các tác nhân khác nhau. Nhóm tác giả kết luận rằng kết tủa bằng ethanol tỏ ra khá ổn định cho cả hai dịch trích khi hiệu suất thu hồi và độ tinh sạch không có sự dao động lớn so với acetone, isopropanol và kể cả  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ .

Từ các kết quả bước đầu, chúng tôi tiếp tục khảo sát một số yếu tố ảnh hưởng chính đến quá trình thu nhận chế phẩm ficin từ quả và như: tỷ lệ giữa dịch chứa enzyme và ethanol 96 % (1/1, 1/2, 1/3, 1/4 và 1/5), thời gian kết tủa protease (30 phút, 60 phút và 90 phút) và nhiệt độ kết tủa protease (1 °C, 3 °C và 5 °C). Thực hiện phương pháp loại suy để lựa chọn các thông số thích hợp cho việc thu nhận protease.

### 3.2 Khảo sát tỷ lệ dịch chứa enzyme/ethanol

Để tiến hành khảo sát năm mức tỷ lệ giữa dịch chứa enzyme/ethanol 96 % khác nhau: 1/1, 1/2, 1/3, 1/4 và 1/5, chúng tôi cố định thời gian kết tủa trong 60 phút và nhiệt độ kết tủa là 5°C. Sau đó, ly tâm thu kết tủa và tiến hành đo hàm lượng protein bằng phương pháp Bradford và hoạt độ protease bằng phương pháp Amano (Hình 1).



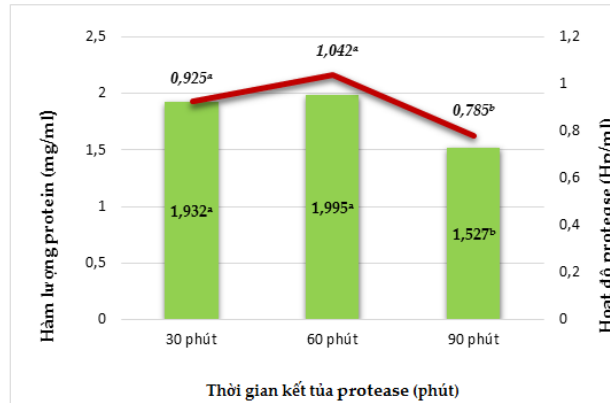
**Hình 1.** Hàm lượng protein và hoạt độ protease biến thiên theo tỷ lệ dịch chứa enzyme/ethanol 96 %; các chữ cái a, b, c, d, e thể hiện sự khác nhau có ý nghĩa thống kê ở độ tin cậy 95 % trên từng dạng biểu đồ.

Các số liệu thực nghiệm ở Hình 1 cho thấy hàm lượng protein và hoạt độ protease có xu hướng tăng tỷ lệ thuận so với lượng ethanol sử dụng trên cùng một loại nguyên liệu. Cụ thể hàm lượng protein ở các mẫu 1/1, 1/2, 1/3, 1/4, 1/5 lần lượt là 1,002, 1,041, 1,269, 1,983 và 1,901 mg/ml, và hoạt tính protease lần lượt là 0,303, 0,464, 0,720, 1,037 và 1,005 Hp/ml. Hàm lượng protein và hoạt độ protease tăng dần theo chiều tăng của lượng ethanol từ mẫu có tỷ lệ 1/1 đến mẫu có tỷ lệ 1/4 và đạt giá trị cực đại ở mẫu có tỷ lệ 1/4 lần lượt là 1,983 mg/ml, 1,037 Hp/ml. Sau đó, hàm lượng protein và hoạt độ protease không tăng nữa cho dù tăng lượng dung môi sử dụng.

Theo lý thuyết, khi tăng lượng dung môi, lượng proteasethu nhận sẽ trở nên nhiều hơn do khi số phân tử dung môi tăng chúng sẽ tách triệt để hơn lớp phân tử nước bao lấy xung quanh phân tử protein, làm giảm tính tan của protein, tăng khả năng kết tủa của chúng. Tuy nhiên, khi chúng tôi tăng lượng ethanol 96 % lên nhiều hơn so với tỷ lệ dịch enzyme/ethanol = 1/4, hàm lượng protein không có sự sai khác về mặt thống kê ở độ tin cậy 95 %, còn hoạt độ protease ở tỷ lệ 1/5 có sự giảm nhẹ. Vì vậy, chúng tôi chọn tỷ lệ dịch chứa enzyme/ethanol 96 % là 1/4 để tiến hành các bước tiếp theo.

### 3.3 Khảo sát thời gian kết tủa protease

Sau khi chọn được tỉ lệ dịch chứa enzyme/ethanol 96 % là 1/4, chúng tôi tiếp tục khảo sát thời gian ở 3 mức: 30 phút, 60 phút và 90 phút ở nhiệt độ 5 °C. Kết quả thu nhận được trình bày ở Hình 2.



**Hình 2.** Hàm lượng protein và hoạt độ protease biến thiên theo thời gian; các chữ cái a, b thể hiện sự khác nhau có ý nghĩa thống kê ở độ tin cậy 95 % trên từng dạng biểu đồ.

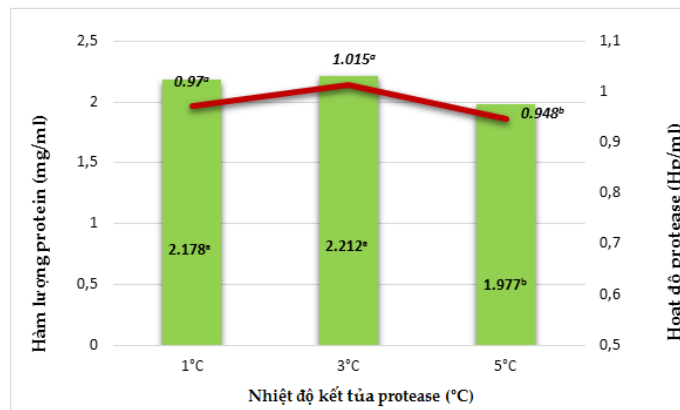
Hình 2 cho thấy xét về mặt thời gian chúng tôi nhận thấy mẫu 1 (30 phút) tiến hành nhanh hơn mẫu 2 (60 phút) nên sẽ rút ngắn thời gian thí nghiệm. Tuy nhiên, phân tích sâu về quá trình nghiên cứu và thu nhận kết quả chúng tôi thấy rằng biên độ kết quả của 3 lần lặp lại đối với mẫu 1 rất lớn (lần 1: 1,711 mg/ml; lần 2: 2,194 mg/ml và lần 3: 1,891 mg/ml), trong khi đó biên độ kết quả của 3 lần lặp lại ở mẫu 2 ổn định hơn (lần 1: 1,915 mg/ml; lần 2: 1,994 mg/ml; lần 3 và 2,076 mg/ml). Ngoài ra, hoạt độ protease có giá trị cao nhất là 1,042 Hp/ml. So sánh kết quả khảo sát thời gian từ 0 đến 160 phút để tách chiết ficin từ nhựa quả và (*Ficus carica cv.*), Hamid Zare và cs. cho thấy protease đạt giá trị cao nhất khi thời gian xử lý từ 60 đến 80 phút [12]. Từ những lập luận trên, chúng tôi chọn thời gian kết tủa protease là 60 phút để thực hiện các bước nghiên cứu tiếp theo.

### 3.4 Khảo sát nhiệt độ kết tủa protease

Tiến hành tương tự, chúng tôi khảo sát 3 mức nhiệt độ là 1°C, 3°C và 5°C, ở tỷ lệ dịch chứa enzyme/ethanol 96 % là 1/4, thời gian 60 phút.

Kết quả khảo sát (Hình 3) cho thấy khả năng kết tủa enzyme protease từ dịch chứa enzyme phụ thuộc vào nhiệt độ. Khi tăng nhiệt độ từ 1 °C lên 3 °C, khả năng khuếch tán cũng như kết tủa protease trong dịch nhựa có sự tăng nhẹ nhưng không thể hiện sự khác nhau có ý nghĩa thống kê; hàm lượng protein tăng tương ứng từ 2,178 mg/ml lên 2,212 mg/ml, nhưng hoạt độ protease của dịch nhựa quả và tăng thể hiện sự khác nhau có ý nghĩa thống kê từ 0,973 Hp/ml lên 1,015 Hp/ml. Khi tăng nhiệt độ kết tủa lên 5 °C, hàm lượng protein và hoạt độ protease có xu hướng giảm đi chỉ còn 1,977 mg/ml và 0,948 Hp/ml. Điều này chứng tỏ rằng trong môi trường có dung môi hữu cơ (ethanol 96 %), khi nhiệt độ càng cao thì khả năng biến tính protease càng lớn dẫn đến hoạt độ giảm. Những kết quả đạt được trong nghiên cứu này cũng phù hợp với công bố của Lại Thị Ngọc Hà, (2009) khi khảo sát nhiệt độ đến sự kết tủa của

enzyme bromelain [3]. Ở 4 °C, hiệu suất thu hồi hoạt tính tổng đạt 82,59 % và hiệu suất thu hồi protein đạt 59,53 %; trong khi đó các giá trị này đạt tương ứng 72,59 % và 56,16 % ở 28 °C. Ngoài ra, trong công trình của tác giả Nguyễn Lệ Hà, thu nhận protease tôm sú có hoạt tính tốt ở vùng nhiệt độ 47–67 °C, đạt giá trị cao nhất ở 62 °C; chúng hầu như không hoạt động tại 0 °C [2]. Kết quả này được công bố trong nghiên cứu khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ trong khoảng 0–92 °C đến khả năng thu nhận protease từ tôm sú.



**Hình 3.** Hàm lượng protein và hoạt độ protease biến thiên theo nhiệt độ; các chữ cái a, b thể hiện sự khác nhau có ý nghĩa thống kê ở độ tin cậy 95 % trên từng dạng biểu đồ.

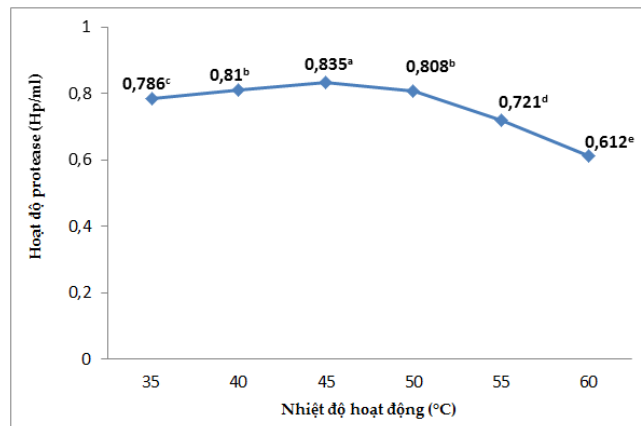
Chế phẩm enzyme ficin thô được thu nhận từ dịch nhựa quả và đạt hàm lượng 2,212 mg/ml khi tỷ lệ dịch chứa enzyme/ethanol 96 % là 1/4, thời gian kết tủa 60 phút và nhiệt độ kết tủa là 3 °C. Để có thể ứng dụng chế phẩm enzyme ficin (tách từ dịch nhựa quả và) trong công nghệ thực phẩm, chúng tôi cần phải khảo sát một số tính chất cơ bản liên quan tới hoạt độ của enzyme này. Trong phần nghiên cứu tiếp theo, chúng tôi khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ hoạt động, pH và độ bền nhiệt của chế phẩm ficin này.

### 3.5 Ảnh hưởng của nhiệt độ đến hoạt độ của chế phẩm ficin

Nhiệt độ là yếu tố ảnh hưởng mạnh đến hoạt độ protease của nhựa vả. Khi nhiệt độ tăng, hoạt độ protease tăng nhưng chỉ đến một mức nào đó, nếu tiếp tục tăng thì hoạt độ của enzyme sẽ giảm vì nhiệt độ cao sẽ làm biến tính protein gây bất hoạt enzyme. Nhiệt độ mà ở đó enzyme hoạt động mạnh nhất gọi là nhiệt độ tối ưu. Mỗi enzyme có một nhiệt độ hoạt động tối ưu khác nhau.

Để khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ đến hoạt độ của chế phẩm ficin thu nhận từ dịch nhựa quả vả, chúng tôi theo dõi ở các mức nhiệt độ 35 °C, 40 °C, 45 °C, 50 °C, 55 °C và 60 °C với cơ chất casein ở pH = 7.

Ở các giá trị nhiệt độ khác nhau, enzyme thể hiện hoạt độ xúc tác khác nhau (Hình 4). Khi tăng nhiệt độ từ 35 °C đến 45 °C, hoạt độ enzyme tăng dần theo nhiệt độ. Tuy nhiên, khi nhiệt độ tiếp tục tăng, hoạt độ của chế phẩm enzyme này không tăng thêm mà bắt đầu có xu hướng giảm, gây nên hiện tượng biến tính nhiệt ở enzyme. Các số liệu nhận được cho thấy 45 °C là nhiệt độ thích hợp cho phản ứng của chế phẩm ficin và cho giá trị hoạt độ protease cao nhất 0,835 Hp/ml. Trong khi đó, nhiệt độ hoạt động của chế phẩm bromelain được chiết xuất từ chồi quả dứa đạt ở 55 °C [3].



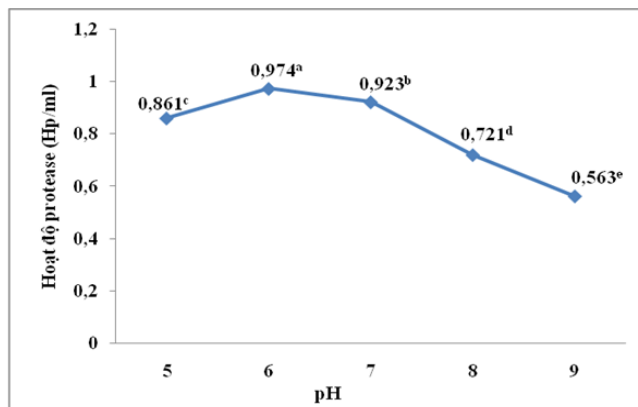
**Hình 4.** Ảnh hưởng của nhiệt độ đến hoạt độ chế phẩm ficin; các chữ cái a, b, c, d, e thể hiện sự khác nhau có ý nghĩa thống kê ở độ tin cậy 95 %

### 3.6 Ảnh hưởng của pH đến hoạt độ của chế phẩm ficin

pH có ảnh hưởng rất lớn đến hoạt độ enzyme. Mỗi enzyme hoạt động mạnh ở một pH nhất định. Để khảo sát ảnh hưởng của pH đến hoạt độ protease của nhựa quả vả, kết tủa protease được hòa tan trong các dung dịch đệm với pH khác nhau (pH = 5, 6, 7, 8 và 9). Sau đó, cho enzyme tác dụng với cơ chất casein ở 30 °C trong 30 phút. Tiếp theo, ly tâm lấy dịch trong và xác định hoạt độ protease theo phương pháp Amano để xác định ảnh hưởng của pH đến hoạt độ của chế phẩm enzyme ficin.

Khi pH tăng từ 5 đến 6, hoạt độ của chế phẩm cũng tăng dần, nhưng nếu tiếp tục tăng pH lên 7, 8 và 9, hoạt độ của chế phẩm lại giảm (Hình 5). Ở pH = 6, giá trị hoạt độ trung bình của ba lần lặp là cao nhất (0,974 Hp/ml). Vì vậy, chúng tôi coi giá trị pH = 6 là pH thích hợp cho hoạt động của chế phẩm enzyme ficin. Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của Kramer và Whitaker trên 5 loại ficin khác nhau và đều cho thấy vùng hoạt độ tối thích nằm trong khoảng pH từ 6 đến 8 [13]. Trong khi đó, tác giả Lại Thị Ngọc Hà công bố pH tối ưu cho hoạt độ xúc tác của bromelain là 6,5 [3].



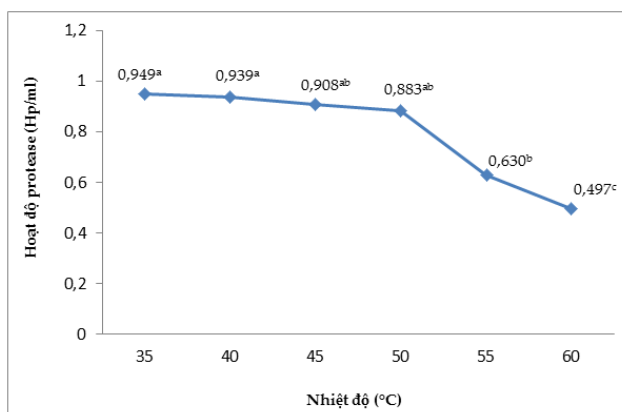


**Hình 5.** Ảnh hưởng của pH đến hoạt độ chế phẩm ficin; các chữ cái a, b, c, d, e thể hiện sự khác nhau có ý nghĩa thống kê ở độ tin cậy 95 %

### 3.7 Khảo sát độ bền nhiệt của chế phẩm ficin

Tính bền nhiệt rất quan trọng cho việc ứng dụng enzyme trong công nghiệp. Để nghiên cứu tính bền nhiệt của protease từ nhựa vảy, enzyme thô được ủ ở các nhiệt độ khác nhau từ 35 °C đến 60 °C trong 60 phút, sau đó đo hoạt độ protease của chế phẩm ficin [14].

Chế phẩm ficin bền ở khoảng nhiệt độ từ 35 °C đến 50 °C sau thời gian ủ là 60 phút. Thậm chí đến 50 °C, hoạt độ protease vẫn còn trên 90 % so với ban đầu (Hình 6). Từ 55 °C trở đi, hoạt độ protease bắt đầu giảm mạnh. Điều này chứng tỏ protease kém bền ở nhiệt độ cao. Nhiệt độ càng cao thì protease bị bất hoạt càng lớn, dẫn đến hoạt độ của chế phẩm giảm sau 55 °C. Độ bền nhiệt của chế phẩm ficin trong nghiên cứu này có kết quả tương ứng với công trình của Kramer và Whitaker (1964) đã công bố trên 5 loại ficin khác nhau và đều cho thấy độ bền nhiệt ở 55 °C sau 60 phút, nhưng đối với chế phẩm Bromelain chỉ bền nhiệt ở 30 °C trong thời gian 72 giờ (Lại Thị Ngọc Hà, 2009) [3, 13].



**Hình 6.** Khả năng bền nhiệt của chế phẩm ficin; các chữ cái a, b, c, thể hiện sự khác nhau có ý nghĩa thống kê ở độ tin cậy 95 %

#### 4 Kết luận

Để thu nhận được dịch chiết enzyme protease từ nhựa quả vả, chúng tôi đã nghiên cứu và chọn được tỷ lệ dịch chứa enzyme/ethanol 96 % là ¼, nhiệt độ kết tủa protein thích hợp là 3 °C trong 60 phút để thu nhận được hàm lượng protein là 2,212 mg/ml và hoạt độ protease là 1,015 Hp/ml là cao nhất. Chế phẩm enzyme ficin hoạt động ở nhiệt độ thích hợp là 45 °C, pH = 6 và bền nhiệt trong khoảng 35–50 °C trong 60 phút.

#### Tài liệu tham khảo

1. Nguyễn Đức Lượng (chủ biên), Cao Cường, Nguyễn Ánh Tuyết, Lê Thị Thủy Tiên, Huỳnh Ngọc Oanh, Nguyễn Thúy Hương, Phan Thị Huyền, Tạ Thu Hằng (2012), *Công nghệ enzyme*, Nxb. Đại học Quốc gia TP. Hồ Chí Minh.
2. Nguyễn Lệ Hà (2015), Protease tinh sạch từ tôm sú *Penaeus monodon* và một số tính chất cơ bản, *Tạp chí Khoa học Công nghệ Thủy sản*, 2, 32–37
3. Lại Thị Ngọc Hà (2009), Nghiên cứu tách và tạo chế phẩm Bromelain từ phụ phẩm dứa, *Tạp chí Khoa học và Phát triển*, 7 (2), 203–211.
4. Nguyễn Văn Mùi (2001), *Thực hành hóa sinh*, Nxb. Quốc gia Hà Nội.
5. Đỗ Thị Bích Thủy, Trần Thị Xô (2006), Nghiên cứu quy trình thu nhận và khảo sát một số tính chất của chế phẩm proteinase *Bacillus subtilis*, *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển nông thôn*, 87, 41–42.
6. Đỗ Thị Bích Thủy (2011), *Hóa sinh thực phẩm*, Nxb. Đại học Huế.
7. Nguyễn Thị Cẩm Vi (2011), Khảo sát sự biến đổi hàm lượng protein hòa tan và hoạt tính bromelain trong quá trình phát triển của quả dứa, *Tạp chí Khoa học – Ứng dụng*, 14, 28–31.
8. Hà Thị Thụy Vy, Trần Thanh Trúc và Nguyễn Văn Mười (2016), Ảnh hưởng của dung môi và thời gian kết tủa đến hiệu quả tinh sạch sơ bộ enzyme protease trích ly từ thịt đầu tôm, *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*, 1, 9–17.
9. Amano (2002), Protease N “Amano” – Assay method for Protease activity (Amano method). *Amano Enzyme Inc.*, Nagoya, Japan.
10. Bradford M. M (1976), A rapid and sensitive microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding, *Anal. Biochem*, 72, 248–254.
11. Devaraj, K.B., Kumar, P.R., Prakash, V. (2008), Purification, characterization and solvent-induced thermal stabilization of ficin from *Ficus carica*, *J. Agric. Food Chem*, 56, 11417–11423.
12. Hamid Zare, Ali Akbar Moosavi-Movahedi, Maryam Salami, Morteza Mirzaei, Ali Akbar Saboury, Nader Sheibani (2012), Purification and autolysis of the ficin isoforms from fig (*Ficus carica* cv. Sabz) latex, *Phytochemistry*, 87, 16–22.
13. Kramer Donald, Whitaker John (1964), Ficus enzymes: II. Properties of the proteolytic enzymes from the latex of *Ficus carica* variety kadota, *The Journal of Biological Chemistry*, 239 (7), 2178–2183.

14. Mohammed Gagaoua, Nawel Boucherba, Amel Bouanane-Darenfed, Ferhat Ziane, Sabrina Nait-Rabah, Kahina Hafid, Hiba-Ryma Boudechicha (2014), Three-phase partitioning as an efficient method for the purification and recovery of ficin from Mediterranean fig (*Ficus carica* L.) latex, *Separation and Purification Technology*, 132, 461–467.
15. Singh, V.K., Patel, A.K., Moir, A.J., Jagannadham, M.V. (2008), Indicaain, a dimeric serine protease from *Morus indica* cv, K2. *Phytochemistry* 69, 2110–2119.
16. Torres, M.J., Trejo, S.A., Obregón, W.D., Avilés, F.X., López, L.M., Natalucci, C.L. (2012), Characterization of the proteolytic system present in *Vasconcellea quercifolia* latex, *Planta*, 236, 1471–1484.
17. Turk, B. (2006), Targeting proteases: successes, failures and future prospects, *Nat. Rev. Drug Discov.*, 5, 785–799.
18. Vander Hoorn, R.A.L. (2008), Plant proteases: from phenotypes to molecular mechanisms, *Annu. Rev. Plant Biol.*, 59, 191–223.

## EXTRACTION AND CHARACTERIZATION OF ENZYME FICIN FROM FIG FRUIT LATEX (*Ficus auriculata* L.)

Vo Van Quoc Bao\*, Nguyen Thanh Trung

HU – University of Agriculture and Forestry, 102 PhungHung St., Hue, Vietnam

**Abstract:** The aim of this work is to study the factors affecting the extraction of enzyme ficin from fig fruits as well as to investigate the characteristics of this enzyme for improving the value of the fig fruits in Thua Thien Hue province. The riped figs gave the highest protein content and protease activity at 2,212 mg/m and 1,015 Hp/m, respectively when the ratio of latex fig/ethanol 96 % was ¼, and the extraction was carried out at 3 °C for 60 minutes. The appropriate temperature and pH for the ficin activity were at 45 °C and 6, respectively. The enzyme was thermostable from 35 °C to 50 °C for 1 hour.

**Keywords:** fig fruit, latex, ficin, protease activity, ethanol